

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390431

研究課題名(和文) TLR/TACI-MyD88経路による唾液腺のIgA産生形質細胞の出現制御機構

研究課題名(英文) Regulatory effect of the TLR/TACI-MyD88 signaling pathway on immune responses associated with the homing of IgA-producing B cells into salivary glands

研究代表者

引頭 毅 (Into, Takeshi)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：10360918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞内シグナル伝達分子であるMyD88が唾液腺に存在するIgA産生形質細胞の出現に及ぼす影響を基盤的研究として解析することにより、口腔免疫機構の一端を解明することである。計画の遂行により明確になったのは、MyD88欠損は唾液腺でのIgA産生にはほとんど影響しないということである。一方、予想外に明確となったのは、雌マウスでみられるシェーグレン症候群様の病態形成がMyD88欠損により顕著に抑制されることである。研究期間中に当初の計画目標に到達はできなかったが、基盤研究としては一定の成果を挙げる事ができた。本基盤を活かしながら、今後も継続して研究を進展させていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this basic research project is to clarify the effect of cellular signaling molecule MyD88-mediated immune responses on the homing of IgA-producing B cells into salivary glands, the mechanism of which underlies basic oral immune defense machineries. Through our execution of the experimental plans, it had been figured out that MyD88 deficiency hardly affected IgA production in mouse salivary glands. However, we have found that mouse MyD88 deficiency remarkably suppresses the lymphoid-associated pathogenesis found in female mice, which resembles the pathogenesis of Sjogren's syndrome in humans. Thus, although this study project had not attained our original aim, we have been able to obtain a certain degree of results that are adequate for a basic research project. For our future investigations, we are planning to make efficient use of the results obtained through this project.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：自然免疫 唾液腺 シェーグレン症候群 自己免疫 IgA

1. 研究開始当初の研究背景

B細胞は抗体産生細胞として機能するため、体液性免疫の主役となり、宿主の感染防御機構においては非常に重要な存在である。骨髄で生まれた未熟なB細胞前駆細胞は、脾臓や二次リンパ組織に移行し、種々のサイトカイン、濾胞樹状細胞や濾胞ヘルパーT細胞などの補助を得ながら抗原認識後に活性化し、B細胞受容体(BCR)のV(D)J遺伝子再構成、クラススイッチリコンビネーション、体細胞超変異といった抗体遺伝子の組換え作業を行い、抗原反応特異性を獲得しながら、形質芽細胞、形質細胞へと成熟化する。これらの一連の過程は種々多様なサイトカインと受容体下流のB細胞内シグナル伝達経路によって制御されている。

粘膜において形質細胞から産生されるIgAは、病原体の侵入阻止や毒素中和作用を持ち、補体活性化を有せず、炎症応答を誘導しないため、恒常的に産生される感染防御因子としては非常に優れている。腸管粘膜では、パイエル板や孤立リンパ濾胞などの二次リンパ組織が誘導組織として機能し、濾胞ヘルパーT細胞に依存的あるいは非依存的にナイーブB細胞がクラススイッチを経てIgA産生B細胞へとスイッチされる。その後、循環帰巣経路を介して実行組織である粘膜固有層に分布し、形質芽細胞や形質細胞へと成熟化して二量体IgAを産生するようになる。このIgAは粘膜上皮の基底膜側に発現するpIgRに結合し、トランスサイト-シスで上皮細胞内を運搬された後、pIgRの細胞外領域が切断されて分泌型IgA(sIgA)となり、管腔へと放出される。

口腔におけるsIgAの産生機構には未だ不明な点が多いが、果たして腸管粘膜で起こるようなIgA産生機構が成立するのであろうか？実際には、口腔粘膜から産生されるIgA量は非常に少なく、口腔粘膜に局在するIgA産生形質細胞も非常に少ないと考えられている。また、アデノイド、口蓋扁桃、舌扁桃等の二次リンパ組織では、IgG産生B細胞が多数を占め、IgA産生B細胞はほとんど見られない。一方、口腔で分泌される体液である唾液の中には、かなり高濃度のsIgAが含まれており、従って口腔のsIgAによる感染防御はほぼ唾液に依存すると考えられている。注目すべきなのは、唾液腺にIgA産生形質細胞が多数局在することであり、特に顎下腺では顕著な細胞数が観察される。従って、唾液腺に局在するIgA産生形質細胞はアデノイド、口蓋扁桃、舌扁桃等の二次リンパ組織に非依存的な誘導組織を介して出現し、おそらくあまり高い抗原特異性を得ないまま、実行組織である唾液腺に分布して口腔の感染防御を担うと考えられるが、その詳細な機構については知られていない。

一般的に、B細胞の分化、増殖、活性化、成熟化やBCRのクラススイッチリコンビネーション(以下クラススイッチ)は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-15、TGF-β、CD40Lなど、種々多様なサイトカインとその受容体、その下流のシグナル伝達によって制御されている。これらに加え、Toll様受容体(TLR)は様々な微生物の「パターン」を認識することで自然免疫系を制御しているが、核酸認識

型のTLR、特にTLR9はDNAを認識することでT細胞非依存的にB細胞の活性化やクラススイッチに関与する。またTNFスーパーファミリー分子メンバーであるBAFFやAPRILは、TNF受容体スーパーファミリーメンバーのTACIを介し、T細胞非依存的にB細胞の活性化やクラススイッチを制御していると考えられている。TLRやTACIはB細胞においてNF-κB活性化に至るシグナル伝達経路を活性化し、クラススイッチを仲介する必須分子AID(activation-induced cytosine deaminase)を誘導することにより、効果的にT細胞非依存的なIgAクラススイッチを誘導することが明らかになってきている。このようなメカニズムの存在は、二次リンパ組織における濾胞ヘルパーT細胞の活性に依存せず、局所でIgA産生形質細胞を誘導するメカニズムの存在を示唆しており、実際、T細胞欠損マウスでも粘膜固有層にIgA産生形質細胞が観察されることから支持される。

TLRの細胞内シグナル伝達は、数種の「アダプター分子」がTLRの細胞内に存在するTIRドメインに会合することで開始される。MyD88は最も主要なアダプター分子として機能するが、興味深いことに、TNF受容体スーパーファミリーに属し、TIRをもたない受容体であるTACIもMyD88を介して細胞内シグナル伝達経路を活性化することが明らかとなっている(He, B. *et al.*, *Nat. Immunol.* 11(9):836-845 (2010))。また、Myd88遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、腸管でのIgA産生量が大きく減少していることが知られており(Tezuka, H. *et al.*, *Nature.* 448(7156):929-933 (2007))。TLRやTACIがMyD88を介してB細胞のクラススイッチを誘導し、IgA産生形質細胞を誘導していることが示唆される。

このような背景を考慮し、果たして唾液腺のIgA産生形質細胞の出現においても、「TLR/TACI-MyD88経路」が何らかの役割を果たしているのか否かを検討していくことは口腔の感染防御機構の理解をより深めるために非常に重要である。

2. 研究開始当初の研究目的

本研究課題「TLR/TACI-MyD88経路による唾液腺のIgA産生形質細胞の出現制御機構」では、平成23-25年度の3年間の研究期間の間に、口腔免疫学の基盤的研究として、

1. 唾液腺、特に顎下腺に局在するIgA産生形質細胞の特徴と由来を免疫学的・組織学的に明確にする。
2. 唾液腺に局在するIgA産生形質細胞の出現におけるMyD88の役割を総合的に解明する。
3. IgA産生B細胞成熟化におけるTLR/TACI-MyD88経路の役割を分子生物学・免疫学的に解明する。
4. IgA産生B細胞成熟化における口腔微生物の抗原・抽出物の影響を分子生物学的・免疫学的に解明する。
5. TLR/TACIを介して効率的に唾液腺に局在するIgA型形質細胞を誘導する方法を探索する。

これらの課題の統合的な解析により、口腔感染防御機構における未解決のIgA産生誘導

機構の解明を目指していくとともに、その産生を人工的に制御する方法を追及することを目指していく。

### 3. 研究開始当初の研究手法予定

本研究計画では3年間の研究期間を通して、マウス・骨髄キメラマウスを用いた *ex vivo*・*in vivo* の実験系・解析系を用い、細分化された以下の課題に沿って解析を進めていく予定である。マウスは阪大微研・審良教授の研究室より有償分与された C57BL/6 マウスをバックグラウンドとした Myd88 欠損マウス (KO) ならびに野生型 C57BL/6J マウス (WT) を飼育・繁殖して実験に供試する。研究の進行状況に応じて、Tlr9 (TLR9) 欠損マウスや Tnfrsf13b (TACI) 欠損マウスを入手し、同様に実験に用いる予定とする。骨髄キメラマウスは、妊娠 17 日目の野生型雌マウスにブスルファンを2日間にわたって腹腔投与し、分娩後、新生仔マウスの肝臓上部に Myd88 欠損マウスの骨髄細胞を注入することで作成する。生後 8 週齢となった仔マウスの末梢血中の白血球を分離採取し、MyD88 の発現が見られないものを骨髄キメラマウス (BM-KO) とする。野生型マウスの骨髄細胞を注入して作成したマウスをコントロール群 (BM-WT) とする。

### 平成 23 年度の研究課題

#### (1) 唾液ならびに糞便中 sIgA の解析

6~8 週齢の KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスから唾液ならびに糞便を採取し、sIgA を ELISA で定量的に検出し、各マウス間の差異を解析する。なお、唾液はピロカルピン誘導性の唾液を用いる。

#### (2) 唾液腺・口腔粘膜の組織学的解析

6~8 週齢の KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスから摘出した目的部位組織に急速凍結置換固定を施し、包埋した後、クリオスタットで凍結組織切片を作成する。各組織切片を抗 IgA 抗体や抗多量体抗体受容体 (pIgR) 抗体で蛍光免疫染色し、口腔粘膜における発現量の差異を解析する。さらに、唾液腺、粘膜固有層の B 細胞、樹状細胞、プラズマサイトイド樹状細胞などの存在を各細胞の特異的マーカー分子に対する抗体を用いて染色し、各マウス間の差異を解析する。

#### (3) 唾液腺 (顎下腺) の形質細胞の免疫学・分子生物学・組織学的解析

6~8 週齢の KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスから顎下腺、NALT、脾臓を摘出し、磁性セルソーティングによって B 細胞・IgA 型形質細胞を分離する。DNA マイクロアレイ解析により、発現遺伝子の差異を解析する。その結果をベースにしてさらに、B 細胞表面抗原分子の発現やサイトカイン産生を FACS で検出し、各マウス間の差異を解析する。さらに、得られたデータを発展させて IgA 産生形質細胞が唾液腺に局在するための特異的ケモカインの同定を試みる。

#### (4) 唾液腺 (顎下腺) の IgA 型形質細胞の由来の解析

C57BL/6 をバックグラウンドとした GFP 発現トランスジェニックマウスから脾臓を摘出し、磁性セルソーティングによって B 細胞を分離する。分離した B 細胞を各種サイトカ

インや TLR リガンド、APRIL、BAFF 等で刺激した後、回収して WT の静脈にインジェクションする。その後、顎下腺に GFP 陽性の IgA 型形質細胞が検出できるかどうかを解析し、唾液腺の IgA 型形質細胞が 2 次リンパ組織に非依存のかどうかを検討する。また OVA を抗原として舌下投与あるいは鼻腔投与し、抗原特異的 IgA 型形質細胞が GFP 陽性かどうか解析する。

#### (5) IgA 型 B 細胞分化における TLR/TACI - MyD88 経路の役割の解析

6~8 週齢の KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスから脾臓を摘出し、磁性セルソーティングによって B 細胞を分離する。分離した B 細胞を各種サイトカインや TLR リガンド、APRIL、BAFF 等で刺激した後、種々の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により解析し、IgA 発現細胞の出現と各マウス間の差異を解析する。また、樹状細胞と T 細胞との共培養系でも同様に実験を行う。その結果をベースにして、B 細胞表面抗原分子の発現やサイトカイン産生を FACS で検出し、各マウス間の差異を解析する。

#### (6) IgA 型 B 細胞分化における口腔微生物の抗原・抽出物の影響の解析

6~8 週齢の KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスから脾臓を摘出し、磁性セルソーティングによって B 細胞を分離する。分離した B 細胞を各種サイトカインや等の存在下で、マウス口腔から分離した各種微生物の破砕物や、抽出分離した抗原・TLR リガンドとともに刺激する。種々の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により解析し、IgA 発現細胞の出現と各マウス間の差異を解析する。その結果をベースにして、B 細胞表面抗原分子の発現やサイトカイン産生を FACS で検出し、各マウス間の差異を解析する。

### 平成 24 ~ 25 年度

基本的に平成 23 年度の研究内容 (1) ~ (6) を継続するが、年度毎にエビデンスを強化させ、追求すべき事象を厳密に絞り込みながら、各研究者が担当課題を 1 つの方向性に向くよう工夫し、かつハイレベルな研究展開を目指す。また、得られたエビデンスを収束させながら、以下の課題を行う。

#### (7) 効率的な唾液腺 IgA 型形質細胞誘導法の探索

(1) ~ (6) の *ex vivo*・*in vivo* 実験系・解析系で得られたデータを検証しながら、顎下腺において抗原特異的 IgA 型形質細胞を人工的に出現させる方法を様々な方向から検討する。この際、KO、WT、BM-KO、BM-WT 各マウスを使用し、*in vivo* での解析を重視しながら、慎重にエビデンスを積み上げる。

#### (8) 研究総括

分担研究者間で連携してディスカッションを重ねながら研究成果を統合的に解析し、得られたデータについて厳密に検証する。研究成果についてさらなる解析が必要な場合や、メカニズムの追及が必要な場合には、トランスジェニックマウスの作成や、*in vitro* での実験系を追加するなどによって順次適切な対応を講じる。公表すべき研究データを詳細に分析し、順次学会発表や論文発表などによって成果発表を行っていく予定とする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 唾液中の IgA 産生と唾液腺形質細胞の分布に関して

研究計画に則って細分化された研究課題を行う中で、MyD88 欠損マウスと野生型マウスの唾液中の各抗体クラスの濃度を詳細に測定、定量化したところ、MyD88 欠損マウスでは IgM ならびに IgG3 サブクラスの抗体濃度が野生型に比べて著しく減少していることが見出された。しかしながら、最も重要視していた唾液中の IgA 濃度は MyD88 欠損マウスと野生型マウスでほとんど差がみられなかった。また、これは予想外であったが、腸管で産生される IgA 量を糞便中の IgA 量を定量することにより測定したところ、MyD88 欠損マウスと野生型マウスで大きな差は認められなかった。つまり、MyD88 欠損マウスで IgA 産生が野生型マウスに比べて大きく減少しているという結果は得られなかった。また、MyD88 欠損マウスの唾液中で減少していた IgM と IgG3 は唾液腺由来ではなく、おそらく血清（骨髄）由来である可能性が強いと思われる。実際に血清中の抗体価を測定してみたところ、MyD88 欠損マウスでは野生型マウスにくらべて IgM と IgG3 が大きく減少していた。

この研究結果を我々は論文などではまだ報告していないが、以前報告されている Nature などの著名誌上で日本の研究者らが発表してきた論文（例：Tezuka, H. *et al.*, Nature. 448(7156):929-933 (2007)）の実験結果とは根本的に異なるものである。今後詳細に検討する必要があるものの、残念ながら、本研究課題はこれらの論文の研究背景をベースに置いて立てられた研究計画であるため、ここで根底から研究計画を見直さなければならぬ可能性が浮上してきた。しかし、なぜ腸管の IgA に関して以前報告された論文とは異なる結果になったのか、一つの重要な可能性として考えられるのは、我々が実験に用いていたマウスは、すべて Myd88 ホモ欠損の雄マウスと Myd88 ヘテロ欠損の雌マウスとを交配させて生まれた Myd88 ホモ欠損マウスを使用していたということである。この背景にあるのは、Myd88 ホモ欠損マウスを長期継代すると、腸内細菌叢の多様性が失われ、野生型とは異なる粘膜免疫が誘導されることである（Wen, L. *et al.*, Nature. 455(7216): 1109-1113 (2008); Larsson, E. *et al.*, Gut. 61(8):1124-1131 (2012)）。以前報告された論文は、Myd88 ホモ欠損マウスの長期継代により腸内細菌叢の変遷が起こり、異常な腸内細菌が代々継代、蓄積され、二次的に IgA 産生に影響している可能性が高いものと思われる。逆に、我々のマウスでは、ほぼ正常な腸内細菌叢をもつ Myd88 ヘテロ欠損の雌マウスから仔に細菌叢が引き継がれているため、Myd88 ホモ欠損の仔でもほぼ正常な IgA 産生が起こっているものと思われる。これらの背景を踏まえ、我々が今後どのように本データを扱っていくのか検討中である。今後、Myd88 ホモ欠損どうしの継代を繰り返した Myd88 欠損マウスを使用すれば、本来予想されたような実験結果を得られる可能性もあるが、それはあくまで腸内細菌叢の変遷による二次

的な効果であることを忘れてはならない。

また我々のマウスにおいて、唾液腺（顎下腺）の組織解析により得られた知見として、Myd88 欠損マウスと野生型マウスの顎下腺に分布する形質細胞数にはほとんど差がないことである。これは唾液腺組織から得られた細胞のフローサイトメトリーによる解析結果でも支持された。これらの実験結果は、唾液中の IgA 量の実験結果を支持するものでもある。

我々の結論としては、MyD88 を欠損していても、唾液腺でも、また腸管でも、MyD88 が直接的に関与して IgA 産生に影響を及ぼすことはほとんど無いということである。もし若干の影響があるとすれば、それは常在細菌叢の変遷による、間接的な効果である可能性が高い。

##### (2) 唾液腺における遺伝子発現に関して

研究計画に則って細分化された研究課題を行う中で、MyD88 欠損マウスと野生型マウスの唾液腺での網羅的な遺伝子発現の相違を比較するため、DNA マイクロアレイを行った。ここでは 8 週齢の野生型雌マウスと MyD88 欠損雌マウスが使用された。この解析結果から明らかになったのは、MyD88 欠損により、至極限られた遺伝子群に上昇あるいは減少がかなり明確に観察されることである。

まず上昇する遺伝子について言及するが、代表例の 1 つはケモカイン Cxcl2 の遺伝子である。なぜ MyD88 欠損によりこの遺伝子の発現が唾液腺で上昇するのかはまだ不明であるが、ケモカインの特性から考慮すると、おそらくは唾液腺に存在する造血系幹細胞由来の骨髄系免疫細胞、特にマクロファージや樹状細胞により産生されていると考えられる。本研究課題の期間中には解明できなかったが、今後の課題としていきたい。

また、MyD88 欠損により発現上昇する遺伝子のさらなる代表例として、Itsn1 遺伝子が挙げられる。ITSN1（インターセクション 1）は細胞質タンパク質であり、これまでの報告によれば、主にエンドサイトーシスにおけるエンドソーム形成に寄与する分子であると言われている。実際には上昇しているのは Itsn1 のスプライシングバリエーションの 1 つであり、本来の ITSN1 よりもかなり分子量が小さく、重要なドメインを欠如した ITSN1 分子をコードするバリエーションのようである。どうしてこのような遺伝子が MyD88 欠損により発現上昇しているのかは定かではないが、我々はこの遺伝子に大きな関心をもっており、今後重点的に研究を進めていく計画を立てているところである。特に、本研究課題の研究代表者を代表者とする平成 26 年度からの基盤研究（C）の研究課題（26462803）が採択されているが、この研究課題では、唾液腺におけるインターセクションの役割を追及していくことを目的としている。本研究課題の期間中には、オーストラリア Monash 大の Pritchard 教授の研究グループから 129 系統マウスを背景とする Itsn1 欠損マウスを分与してもらったことができたため、現在、B6 系統と継代交配して B6 を背景とするコンジェニック系統の Itsn1 欠損マウスを作製しているところである。またこれに加えて、本研究課題

の期間中に Itsn1 のパラログ遺伝子である Itsn2 遺伝子を欠如する B6 を背景としたノックアウトマウスを開発することができた。今後は本研究課題中に得られてきた基盤的知見と、これらのマウスを利用することにより、唾液腺におけるインターセクチンの機能を明確にしていく予定である。

次に、MyD88 欠損により、発現に減少がみられるものについて言及する。これらの遺伝子群は、発現が上昇する遺伝子群に比べてかなり多数であったが、それらの詳細な解析によって明確になってきたのは、そのほとんどは B 細胞と T 細胞に特異的に発現する遺伝子群と、さらにリンパ組織形成時に発現誘導が見られる遺伝子群であったことである。このような結果が得られた理由を当初は全く理解できずに苦悩していたが、最終年度あたりによりよく理解できてきたのが、どうやら B6 系統の野生型の雌マウスでは、唾液腺に異所性の病的なリンパ組織（いわゆる三次リンパ組織）の形成が開始されていることである。これはヒトではシェーグレン症候群における外分泌腺（特に唾液腺と涙腺）へのリンパ球浸潤と三次リンパ組織形成の病態と類似するものである。つまり、野生型の雌マウスで起こるシェーグレン症候群様の初期の病態形成反応が、Myd88 欠損によって起こらなくなる可能性を示唆している。ところが、野生型の B6 マウスでは、遺伝子レベルでは明確な変化を確認できるものの、組織レベルではあまり明確な病態形成を示唆する組織像を観察することができない。そこで、現在我々は、唾液腺において明確なシェーグレン症候群様の病態形成が観察されるモデルマウスである NOD マウスならびに、Fas 遺伝子に変異をもつ lpr マウスの両者において、B6 系統の Myd88 欠損マウスと継代交配し、各コンジェニック系統の Myd88 欠損マウスの樹立を進めている。将来的にこれらのマウスの解析を進めることにより、なぜ MyD88 がシェーグレン症候群様の異所性リンパ組織形成に関与するのかが明確になっていくものと確信しているところである。

以上のように、本課題の研究期間中にはまだ途中ではあるものの、かなり重要な基盤的知見が数多く得られてきており、現在、各知見について精査を進めているところであり、将来の研究発展につながる研究成果が得られていると言える。

### (3) MyD88 の作動メカニズムに関するオートファジーと関連した分子生物学的知見について

唾液腺における IgA 産生について、MyD88 を介したシグナル伝達経路がほとんど影響していないことを示唆する実験結果が得られていたことから、本来の研究計画の軌道修正を迫られることになった。一部はシェーグレン症候群様のフェノタイプに MyD88 がどのように関与するのかが追及していくことを目的とする方向性で、現在も研究を継続しているところである。また、他の研究目的を本来の研究目的から大きく軌道修正し、分子生物学の基本に立ち戻る意味で、MyD88 の根本的な分子作動機構についての研究を進めることに行きついた。特に、我々が以前から着

目していた、MyD88 を介したシグナル伝達経路を負に制御する「オートファジー」のメカニズムとの関連性についての解析である。ここでは研究期間中に得られた研究成果について報告を行う。

近年、TLR シグナルはオートファジー (autophagy) を誘導する経路を活性化し、細胞内侵入性細菌の排除を行うことが示唆されてきている。元来オートファジーとは、細胞飢餓時に自己の細胞質をリソソームに依存的に分解する細胞生存戦略の一環であり、その標的には特異性がないものと考えられてきた。しかし最近、オートファジーはある種のストレスによっても誘導され、このような場合には特定の標的が分解を受けることが分かってきた。例えば、ミスフォールディングなどで生じた不要タンパク質は「アグリファジー (aggrephagy)」、ダメージを受けたミトコンドリアは「ミトファジー

(mitophagy)」、細胞質に侵入した細菌やウイルスは「ゼノファジー (xenophagy)」と呼ばれる「選択的オートファジー」の機構を得て分解を受ける。このような過程においては、細胞質のユビキチン認識分子群である「オートファジー受容体 (autophagic receptors)」が標的上のユビキチン化を識別し、これを細胞質内で特異的に凝集化させることでオートファジーによる分解に特異性を与えていることが報告されている。現在までに、ゼノファジーに関与するオートファジー受容体として SQSTM1 (または p62)、NDP52 や optineurin が同定されている。TLR を介したゼノファジー誘導機構の解析が進む一方で、オートファジー、あるいはオートファジー受容体が TLR シグナルにどのような作用を及ぼすのかについてはほとんど理解されていない。そこで我々は、TLR シグナルの活性化に伴い、MyD88 と TRAF6 にオートファジー受容体である SQSTM1 と HDAC6 が会合し、これらを細胞質で凝集化させ、アグリファジーによって分解することを見出した (Into, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285(46): 35759-35769 (2010))。このような機構を介してオートファジー受容体は TLR シグナルを結果的に抑制するが、興味深いことに、ストレス応答性 MAPK (p38・JNK) の活性化は抑制されるが、NF- $\kappa$ B 経路はほとんど影響を受けない。さらに最近、我々は脱ユビキチン化酵素 A20 の発現を RNAi で干渉した状態において、TLR アダプタータンパク質の一つである TRIF と TRAF6 が TLR3 の刺激に伴って、アグリファジーで分解されることを見出した。TRIF に会合するオートファジー受容体のスクリーニングにより、NDP52 が特異的に会合していることを見出した。NDP52 は A20 の干渉下では、TRAF6 によってユビキチン化されることで活性化されるようであり、その後 TRAF6 を巻き込んだ凝集塊を形成する。NDP52 は TRIF TRAF6 の分解を介して、NF- $\kappa$ B 経路ならびに IRF3 経路の両者を抑制することができる。しかし、NDP52 のこのような機能は通常、A20 によって不活性化されている。このようなメカニズムは MyD88 においても機能していることが明らかになっている (Inomata, M. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 69(6): 963-979 (2012); Inomata *et al.*, *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., 37(4):509-514 (2013) )  
このように、いくつかのオートファジー受容体には、TLR シグナルを負に調節する機能があることが分かってきた。我々の研究成果により、今まで理解されてこなかったオートファジー受容体による TLR シグナルの制御機構の存在が明白になってきたわけである。

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Inomata M., Niida S., Shibata K., and Into T.  
Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20.  
Cell. Mol. Life Sci., 69(6): 963-979 (2012) 7.047

Inomata M., and Into T.  
Nuclear dot protein 52, an autophagy-associated protein, regulates Toll-like receptor signaling.  
J. Oral Biosci., 54(3):151-154 (2012)

Into T., Inomata M., Takayama E., and Takigawa T.  
Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling.  
Cell. Signal., 24(6): 1150-1162 (2012)

Inomata M., Into T., Niida S., and Murakami Y.  
Atg5 regulates formation of MyD88 condensed structures and MyD88-dependent signal transduction  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37(4):509-514 (2013) 2.500

引頭 毅  
粘膜を防御する抗体クラスとその産生誘導機構  
岐阜歯科学会雑誌 40(3): 209-228 (2014)

[学会発表](計8件)

猪俣 恵, 引頭 毅  
オートファジーによる Toll 様受容体を介した細胞内シグナル伝達の調節  
第 53 回歯科基礎医学会学術大会(岐阜)

引頭 毅, 猪俣 恵, 柴田健一郎, 村上幸孝  
抗菌ペプチド LL-37 は異種の Toll 様受容体リガンドによる歯肉線維芽細胞の応答に対して異なる効果を発揮する  
第 53 回歯科基礎医学会学術大会(岐阜)

猪俣 恵, 新飯田 俊平, 柴田健一郎, 引頭 毅  
NDP52 は選択的オートファジーの誘導によって Toll 様受容体シグナルを負に制御する  
第 53 回歯科基礎医学会学術大会(岐阜)

Inomata, M., Shibata K., and Into T.  
Regulation of Toll-like receptor signaling by human NDP52-mediated selective autophagy  
The 40th Annual Meeting of the Japanese Society

for Immunology (Chiba)

引頭 毅  
招待講演: TLR シグナルを制御するオートファジー受容体  
第 79 回日本細菌学会北海道支部学術懇談会(札幌)

Inomata, M., and Into T.  
Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy.  
The 6th International Symposium on Autophagy (Okinawa)

Into T., Inomata, M., and Shibata K.  
Myd88 deficiency suppresses accumulation of B-1a cells in submandibular glands.  
The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (Kobe)

引頭 毅, 滝川俊也, 柴田健一郎  
シグナル伝達分子 MyD88 は顎下腺における B-1 細胞浸潤の制御と唾液中の抗体産生の調節に関する  
第 55 回歯科基礎医学会学術大会(岡山)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ  
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~bac/index.html> (準備中)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
引頭 毅 (INTO, Takeshi)  
朝日大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10360918

(2) 研究分担者  
滝川 俊也 (TAKIGAWA, Toshiya)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90263095

高山 英次 (TAKAYAMA, Eiji)  
朝日大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70533446

猪俣 恵 (INOMATA, Megumi)  
朝日大学・歯学部・助教  
研究者番号: 40553798

(3) 連携研究者  
柴田 健一郎 (SHIBATA, Ken-ichiro)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 50145265